

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462447

研究課題名(和文) 内因性NOS阻害物質代謝酵素の導入による肺血圧低下効果

研究課題名(英文) Effect of endogenous NOS inhibitor on pulmonary arterial pressure

研究代表者

新堀 博展 (Shinbori, Nobuhiro)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：60404993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素(NO)は血管拡張などの様々な生理機能を担い、肺高血圧症では内皮機能の障害からNOの産生が減弱している。我々はモノクロタリン誘発肺高血圧ラットを用い、肺血管内皮機能の減弱となす内皮型一酸化窒素合成酵素eNOSの活性低下の機序を検討した。内因性eNOS阻害物質であるADMAの増加とその合成酵素であるPRMT2の発現亢進、および代謝酵素DDAH1,2の発現減少が認められた。更に、eNOSと基質L-arginineを競合するarginaseの発現亢進もみられ、肺血管内皮期の低下に複数の経路、物質が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Impairment of endogenous release of nitric oxide (NO), which causes vascular vasodilation and inhibition of smooth muscle cell proliferation, is well known to play a critical role in developing pulmonary hypertension (PH). We explored the mechanism of impaired endothelial function and eNOS activity in PH using monocrotaline-induced PH rats. Increase in PRMT2 and decrease in DDAH1 and DDAH2 in the PH model were associated with increased ADMA contents and consequent impairment of NOS activity. These results may be potentially useful to lower ADMA level for therapeutic benefit.

研究分野：麻酔

キーワード：肺高血圧 一酸化窒素 内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) は生体内で血管拡張などの様々な生理機能を担っている。血管において NO を合成する内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の活性や NO 産生は様々な経路により修飾される。近年、内因性の一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害物質である asymmetric dimethylarginine (ADMA) が NO 産生に影響を与えることが知られている(2)。ADMA が NO 産生に影響を与える機序として、eNOS の基質である l-arginine がジメチル化された ADMA が l-arginine と競合し eNOS 活性、NO 産生を低下させる、とされている(1)。肺高血圧症においては内皮機能の減弱が知られており、ADMA の増加が NO 産生を低下させることが示唆されている(3)。

2. 研究の目的

本研究において我々は、モノクロタリン (MCT) 誘発肺高血圧ラットを用い、肺血管内皮機能の減弱、eNOS 活性低下の機序を検討し、肺高血圧治療につながる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

8週齢雄SDラットにモノクロタリンを皮下注射し肺高血圧ラットを作成、皮下注射4週間後に血行動態測定を行った。全身麻酔下に気管挿管し人工呼吸管理とした。大腿動脈より観血的動脈圧、頸静脈より右室圧をそれぞれカテーテルを挿入して測定した。

また、摘出肺血管リング標本を用いた等尺性張力測定を行った。肺血管における内皮依存性弛緩反応を測定した。更に、arginase 等の各種阻害剤の存在下で、弛緩反応への影響を検討した。

肺組織におけるタンパク発現測定量を western blot analysis により行った。

肺組織における eNOS 活性及び、ADMA の定量

を市販のキットにより行った。

4. 研究成果

肺高血圧ラットの摘出肺血管を用いた等尺性張力測定において、アセチルコリン刺激による内皮依存性弛緩反応 endothelium dependent relaxation (EDR) が減弱し(図1)、また eNOS 活性の低下を認めた(図2)。

図1 肺血管リング標本における等尺性張力測定。内皮依存性弛緩反応(EDR)。MCTラットにおいて有意に減弱している。(*P<0.05)

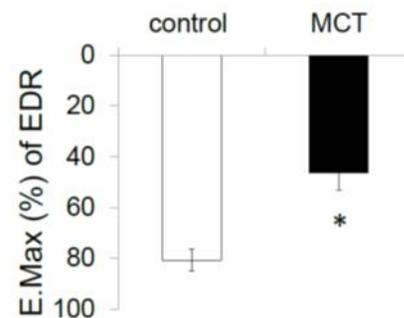
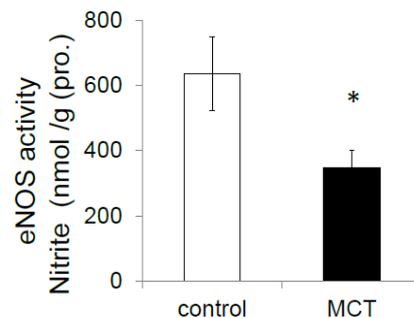


図2 肺組織における eNOS activity MCTラットにおいて有意に減弱している。(*P<0.05)



一方で、eNOS 発現量は正常と肺高血圧ラットで有意差は無かったことから (図 4) eNOS 活性を阻害する機序の検討を行った。肺組織において内因性 NOS 阻害物質である ADMA が増加しており (図 3) この合成酵素である protein arginine methyltransferases 2 (PRMT2) の発現亢進と、代謝酵素である dimethylarginine dimethylaminohydrolases1,2 (DDAH1,2) の発現低下がみられた (図 4)。従って、これら ADMA の合成、代謝に関わる酵素の増減により ADMA 増加を来し、NOS 活性に影響を与えている可能性が示唆された。

図 3 肺組織における ADMA 含有量測定

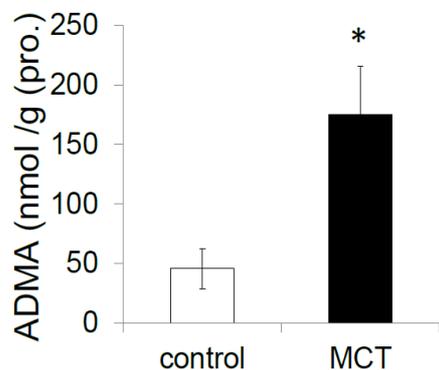


図 4 A 肺血管組織における DDAH1,2, arginase, PRMT1, 2, eNOS 発現量 (western blot analysis)

A

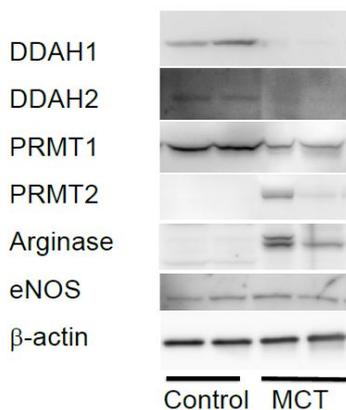
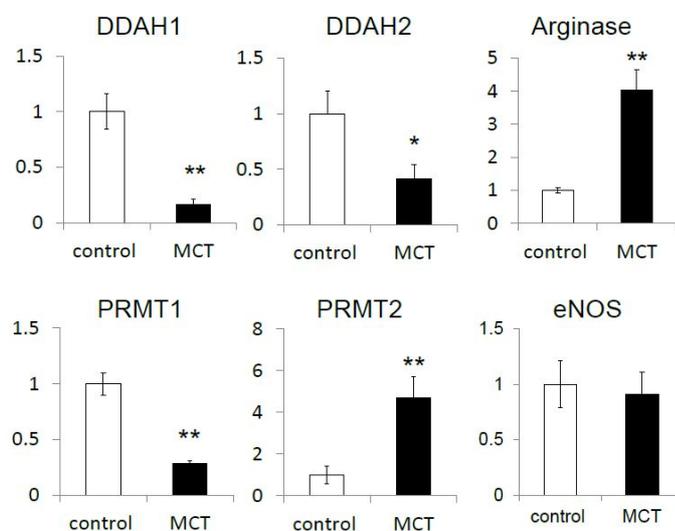


図 4 B



一方、これらの実験過程において、肺高血圧ラットモデルの肺組織において、eNOS と共に l-arginine を基質とする arginase の著しい発現亢進も観察された (図 4 B)。Arginase は肝臓で多く発現し、尿素回路の一部としてアンモニア解毒等に関与しているが、血管疾患での役割は殆ど知られていない。eNOS と基質である l-arginine を競合する arginase の発現亢進により、eNOS の l-arginine に対する availability が低下するとされる。摘出したラット肺血管の等尺性張力測定において、正常ラットでは内皮依存性弛緩反応は arginase 阻害剤存在下で増強された。一方、肺高血圧ラットでは回復しなかった。このことから、arginase が eNOS 活性に関与している可能性が示唆されたが、肺高血圧ラットにおける eNOS 活性低下は、arginase の発現亢進のみでなく、同時に複数の要因も関与していると思われた。

以上より、肺高血圧モデルにおける eNOS 活性低下は、少なくとも部分的に ADMA の増加が関与している可能性が示唆された。eNOS 活性の回復を目的として ADMA の代謝酵素である DDAH1,2 の発現を、レンチウイルスベクターを用いて肺へ遺伝子導入を試み

た。しかし、安定した発現量が得られず効果を検証するには至らなかった。

まとめ

モノクロタリン誘発肺高血圧モデルにおいて、肺血管内皮機能、eNOS 活性の低下がみられ、同時に内因性 eNOS 阻害物質 ADMA の増加、その合成酵素である PRMT2 の発現亢進、および代謝酵素 DDAH1,2 の発現減少が認められた。更に、eNOS と基質 L-arginine を競合する arginase の発現亢進もみられ、肺血管内皮期の低下に複数の経路、物質が関与している可能性が示唆された。

<引用文献>

1. **Bulau P, Zakrzewicz D, Kitowska K, Leiper J, Gunther A, Grimminger F, and Eickelberg O.** Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 292: L18-24, 2007.

2. **Teerlink T, Luo Z, Palm F, and Wilcox CS.** Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 60: 448-460, 2009.

3. **Zakrzewicz D and Eickelberg O.** From arginine methylation to ADMA: a novel mechanism with therapeutic potential in chronic lung diseases. *BMC pulmonary medicine* 9: 5, 2009.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

The European Anesthesiology Congress 2014
1st June 2014, Stockholm, Sweden

Yusuke Mizuno, Shinbori Hironobu, Takahisa Goto

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新堀 博展 (SHINBORI, Hironobu)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：60404993

(2)研究分担者

渡邊 至 (WATANABE, Itaru)

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：20534142

水野 祐介 (MIZUNO, Yusuke)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：80433192

川上 裕理 (KAWAKAMI, Hiromasa)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構
神奈川県立こども医療センター(臨床研究
所)・医長

研究者番号：90407958

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし